

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Bixa orellana* (BIXACEAE) E *Maytenus ilicifolia* (CELASTRACEAE)

Mariangela Frabetti Gomes¹

Vanessa Tiliaké Berta Silva²

Antonio Laverde Jr³

Orlando Seiko Takemura³

GOMES, M. F.; SILVA, V. T. B.; LAVERDE Jr, A.; TAKEMURA, O. S. Avaliação da atividade antioxidante de extratos das folhas de *Bixa orellana* (BIXACEAE) e *Maytenus ilicifolia* (CELASTRACEAE). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, Umuarama, v. 12, n. 3, p. 169-173, set./dez. 2008.

RESUMO: A origem de várias doenças degenerativas, como cardiopatias, aterosclerose, problemas pulmonares, entre outras, está relacionada aos danos promovidos pelos radicais livres. Sugere-se que o consumo de vegetais ricos em substâncias antioxidantes pode diminuir a incidência de algumas doenças. *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), conhecida popularmente como espinheira-santa, é uma árvore de pequeno porte, cujas folhas são utilizadas como antiulcerogênicas, para dispepsias e outros problemas gástricos. A espécie *Bixa orellana* (Bixaceae) popularmente é conhecida como urucum. Suas sementes são utilizadas como expectorante, antiespasmódico e também para queimaduras. Já as folhas são utilizadas terapeuticamente para afecções do estômago, doenças coronarianas, intestino, afecções respiratórias e urinárias, e também como afrodisíaco. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante dos extratos brutos e frações de *Bixa orellana* (EBO e FBO) e *Maytenus ilicifolia* (EMI e FMI), utilizando o radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Os extratos hidroalcoólicos EBO e EMI mostraram intensa atividade antioxidante na concentração 1000µg/mL apresentando a inibição de 91,6±1,1% e 90,1±1,1%, respectivamente. Os extratos fracionados FBO e FMI mostraram atividade nos extratos polares: acetato de etila e metanol. FBO apresentou inibição na concentração de 1000µg/mL de 90,7±0,15% em acetato de etila e 93,6±0,4% em metanol, enquanto FMI apresentou a inibição de 95,4 e 95,7% para respectivas frações. A cromatografia de camada delgada e posterior revelação com solução de DPPH indicaram diferentes substâncias com atividade antioxidante nos extratos EBO e EMI, e também nas frações FBO e FMI, confirmando assim nossos prévios resultados dos testes *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: Antioxidantes; DPPH; Radicais livres; *Bixa orellana*; *Maytenus ilicifolia*.

EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LEAVES EXTRACT OF *Bixa orellana* (BIXACEAE) AND *Maytenus ilicifolia* (CELASTRACEAE)

ABSTRACT: The origin of several degenerative diseases as cardiac diseases, atherosclerosis, lung problems among other, are related to the damages promoted by the free radicals. It is suggested that the consumption of vegetables rich in antioxidant substances can reduce the incidence of some diseases. *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) known popularly as espinheira-santa is a small tree, whose leaves are used as antiulcerogenic, for dyspepsias and other gastric problems. The seeds of *Bixa orellana* (Bixaceae) popularly known as urucum are used as expectorant, spasmolytic and also for burns. Already the leaves are therapeutically used for stomach dysfunctions, coronaries diseases, intestine, breathing and urinary affections, and also as aphrodisiac agent. The aim of the present work was to assess the antioxidant capacity of the crude extracts and fractions of *Bixa orellana* (EBO and FBO) and *Maytenus ilicifolia* (EMI and FMI) using the radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). The hydroalcoholic extracts EBO and EMI showed intense antioxidant activity at the concentration of 1000µg/mL showing the inhibition of 91.6±1.1% and 90.1±1.1%, respectively. The ethyl acetate and methanol polar fractions of FBO and FMI fractions showed high activity. FBO presented inhibition in the concentration of 1000µg/mL of 90.7% and 93.6%, while FMI the inhibition of 95.4 and 95.7% for respective fractions. The thin layer chromatography with subsequent viewing with DPPH solution revealed different substances with antioxidant capacity in the extracts EBO e EMI, and also in the fractions FBO e FMI, this way confirming our previous results.

KEYWORDS: Antioxidants; DPPH; Free radicals; *Bixa orellana*; *Maytenus ilicifolia*.

Introdução

A espécie *Bixa orellana* L. pertence à família Bixaceae, sendo popularmente conhecida como urucum, açafrão, açafrão-da-terra, achiote, annatto, conforme a região (COELHO et al., 2003). É um arbusto grande ou árvore pequena, com 3-5 m de altura, cujo tronco é revestido por casca parda e a copa é bem desenvolvida (LORENZI; MATOS, 2002). O principal produto é a semente, que apresenta cobertura rica em bixina, um corante do grupo dos carotenóides, de grande interesse nos mercados nacional e internacional. No entanto, as folhas são utilizadas terapeuticamente para afecções do estômago, doenças coronarianas, intesti-

no, afecções respiratória e urinária e como afrodisíaco (COELHO et al., 2003). Segundo os mesmos autores, o estudo fitoquímico revelou a existência, nas folhas, de um óleo volátil contendo mono e sesquiterpenos, entre os quais destacam-se o ishwarano e vários flavonóides. De acordo com Harborne (1975), foram identificadas as seguintes substâncias, presentes todas nas folhas de *B. orellana*: Apigenina-7-bisulfato; Cosmoisina; Cinarosideo; Hipoletina-8-bisulfato; Luteolina-7-bisulfato. Terashima et al. (1991) identificaram a molécula Isoescutelareína.

A espécie *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. pertence à família *Celastraceae*, sendo conhecida popularmente no Brasil como espinheira-santa, em alu-

¹Farmacêutica graduada pela UNIPAR – Sede

²Bióloga graduada pela UNIPAR – Sede

³Professor Titular da Unipar – Sede.

Contato: takemura@unipar.br

são às suas folhas que possuem bordas espinhosas e propriedades medicinais (LORENZI; MATOS, 2002; MARIOT; BARBIERI, 2007). O uso medicinal mais comum da espinheira-santa é para o tratamento de gastrites, úlceras gástricas e duodenais, laxante leve, afecções renais e hepáticas. Souza-Formigoni et al. (1991) comprovaram a ação protetora do abafado (infuso) de *M. ilicifolia* contra o desenvolvimento da úlcera experimental em ratos, tanto por via oral, como por via intraperitoneal. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que o efeito protetor da “espinheira-santa” é comparado ao da cimetidina, a qual é utilizada como anti-histamínico de ação inibitória sobre a hemorragia digestiva e sobre a secreção gástrica de ácidos, comumente observados na úlcera péptica. As folhas são constituídas principalmente por compostos terpênicos, fenólicos, fitoesteróides e alcalóides (ITOKAWA et al., 1991; MARIOT; BARBIERI, 2007).

Muitos estudos vêm sendo dirigidos para caracterização das propriedades antioxidantes de plantas, e identificação dos constituintes responsáveis por estas atividades (GOVINDARAJAN et al., 2003; MAHAKUNAKORN et al., 2004;).

Sugere-se que haveria relação inversa entre a dieta com alimentos ricos em antioxidantes e o número de incidências de doenças humanas. Portanto, a pesquisa para determinação de antioxidantes naturais tem sido muito importante (MAVI et al., 2004). O potencial antioxidante da bixina, carotenóide presente nas sementes de *B. orellana*, foi avaliado anteriormente, porém, as folhas ainda não foram objetos de estudo com relação à atividade antioxidante (LING, 2005). E também que os extratos fracionados das folhas de *M. ilicifolia* ainda não foram avaliados quanto à sua capacidade antioxidante.

O ensaio utilizando o radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) é considerado um método válido e fácil para avaliação da atividade sequestradora dos antioxidantes, uma vez que o radical é estável e não precisa ser gerado, como acontece em outros métodos (SANCHES-MORENO, 2002; SILVA, et al. 1999).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante dos extratos totais e extratos fracionados de *M. ilicifolia* e *B. orellana*, pelo método espectrofotométrico, utilizando o DPPH.

Materiais e Métodos

Material botânico

As folhas de *B. orellana* e *M. ilicifolia* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense - Umuarama - PR, no mês de junho de 2006. As espécies foram identificadas pela Prof. Ezilda Jacomassi - Universidade Paranaense - Campus Sede, e exsiccatas dos materiais estão depositadas no Herbário HEUP (Herbário Educacional Universidade Paranaense), com o número de registro 2062 e 2063, respectivamente.

As folhas foram secas em estufa com circulação de ar, com temperaturas inferiores a 40°C, e pulverizadas em trituradores industriais. Os materiais foram armazenados em sacos plásticos de polipropileno, até o momento do uso.

Reagentes e materiais

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), quercetin foram adquiridos da companhia Sigma/Aldrich. As placas cromatográficas de Sílica-gel F₂₅₄ utilizados foram da marca Merck. Todos os solventes utilizados no trabalho foram de grau analítico marca Synth ou equivalente.

Preparação dos extratos

Para preparação dos extratos hidroalcoólicos foram utilizadas 5 g das folhas de *B. orellana* (EBO) e *M. ilicifolia* (EMI) maceradas em 150 mL de álcool a 70% por um período de 72 horas. As frações hexano (FHBO e FHMI), diclorometano (FDBO e FDMI), acetato de etila (FAEBO e FAEMI) e metanol (FMBO e FMMI) foram obtidos utilizando o aparelho de Soxhlet, utilizando a relação de 10 g das plantas em pó para 100 mL de cada solvente utilizado na ordem de polaridade crescente (hexano a metanol). Em seguida, foram calculados os teores extrativos para os respectivos extratos, para o ajuste da concentração a ser utilizada nos experimentos.

Alíquotas dos respectivos extratos hidroalcoólicos e fracionados referentes a 1 mg de extrato foram evaporados sob corrente de ar quente, com temperatura não superior a 40°C, e solubilizados em 1 mL de metanol, para avaliação da atividade antioxidante.

Avaliação da capacidade antioxidante pelo método de DPPH

Os experimentos foram realizados em triplicata, com repetições (n=6). A atividade antioxidante foi determinada por espectrofotometria, utilizando 2,9 mL de uma solução do radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) 60 µM diluídos em metanol, e foram adicionados 0,1 mL dos diferentes extratos. As amostras analisadas foram comparadas com uma amostra padrão de quercetina na concentração de 100 µM. (GOVINDARAJAN et al., 2003; SOUZA; GIOVANI, 2004). As leituras das absorbâncias foram realizadas 20 minutos após a reação, utilizando o espectrofotômetro Fento modelo 700 Plus, em 515 nm (QUIAN; NIHORMBERI, 2004).

Inicialmente, os extratos foram submetidos a uma avaliação na concentração de 1000 µg/mL, e os extratos das plantas que tiveram atividade significativa no teste preliminar foram avaliados em detalhes (dose dependência) em diferentes concentrações a partir de diluições realizadas (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,62 µg/mL).

Cromatografia em camada delgada com revelação em DPPH.

Foram realizadas análises por cromatografias de camada delgada (CCD) utilizando placas cromatográficas Merck de sílica gel 60 F₂₅₄ com a fase móvel: acetato de etila:metanol:água destilada (9,5: 0,5: 0,5) (Farmacopéia brasileira, 2002). Aliquotas dos extratos hidroalcoólicos (EBO e EMI), hexano (FHBO e FHMI), diclorometano (FDBO e FDMI), acetato de etila (FAEBO e FAEMI) e metanol (FMBO e FMMI) foram aplicados nas bases cromatográficas. As placas foram reveladas com uma solução de DPPH na concentração de 2mg/mL de metanol (CUENDET, 2000).

Resultados e Discussão

Avaliação da capacidade antioxidante pelo método de DPPH

A atividade antioxidante dos diferentes extratos de *B. orellana* e *M. ilicifolia* foi avaliada utilizando o radical livre de DPPH.

Nos testes realizados, a quercetina 100 µM foi utilizada como padrão positivo, e a inibição média nas avaliações foi de 95,7±1,3%. A quercetina é um flavonóide que tem sua atividade antioxidante comprovada. Matsuura et al. (2002) relata a atividade da quercetina na concentração de 20 µM, como tendo uma inibição de 73,5%.

Para avaliação prévia da atividade antioxidante, os extratos EBO e EMI foram testados previamente na concentração de 1000µg/ mL, os extratos EBO e EMI apresentaram inibição de 91,6±1,1% e 90,1±1,1%, respectivamente.

Uma vez confirmada a existência da capacidade antioxidante dos extratos, diferentes doses de EBO e EMI foram avaliadas em um teste de dose dependência. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 1. A partir de 31,2 µg/ mL, (inibição de 6,0±2,0% e 8,9±1,3%, respectivamente). Nas concentrações de 125; 250 e 500 µg/ mL do extrato EBO, as inibições foram de 34,2±4,0%; 59,5±4,3 % e 90,2±1,4%, respectivamente. O extrato EMI mostrou inibição de 25,2±1,3%; 44,6±2,4% e 76,7±3,4% nas concentrações de 125; 250 e 500 µg/mL, respectivamente.

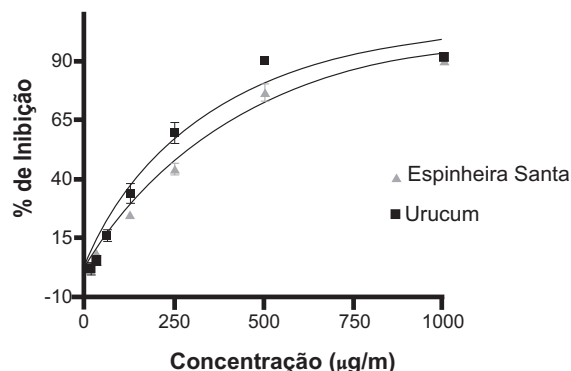


Figura 1: Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos EMI e EBO. Resultados são expressos em média ±EPM.

Na tentativa de conhecer a natureza das substâncias presentes nos extratos EBO e EMI, frações foram preparadas e sua atividade antioxidante avaliada previamente na concentração de 1000 µg/ mL. As frações mais polares (FAEMI e FMMI) de *M. ilicifolia* foram as que apresentaram capacidade antioxidante mais intensa, em torno de 95%. O mesmo aconteceu com as frações FAEBO e FMBO, que apresentaram inibição de 90,7 ± 0,15% e 93,6 ± 0,4%, respectivamente (Figuras 2 a, b).

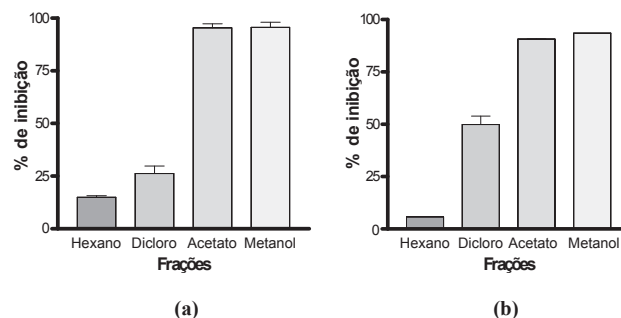


Figura 2: Capacidade antioxidante das frações de (a) *M. ilicifolia* e (b) *B. orellana*, nas concentrações de 1000µg/mL. Resultados são expressos em média ± EPM.

As FHMI e FDMI foram excluídas dos testes, pois demonstraram baixa inibição em 1000µg/ mL, (14,9 ± 0,3% e 26,2 ± 1,5%, respectivamente) (Figura 2 a). O mesmo ocorre para as frações menos polares de *B. orellana* (Figura 2 b).

As frações mais polares de ambas as plantas (metanol e acetato de etila) apresentaram atividade antioxidante mais intensa, e por isso foram selecionadas para serem testadas as doses-dependência.

A fração FAEMI apresentou intensa capacidade antioxidante, inibindo a absorvância a partir da dose mais baixa testada (15,625µg/mL) apresentando uma inibição de 7,9 ± 0,6%, e nas demais concentrações testadas, percebendo-se uma dose dependência até a concentração de 500 µg/mL, em que a inibição observada foi de 93,4 ± 0,2%. O mesmo aconteceu com o extrato FMMI (Figura 3).

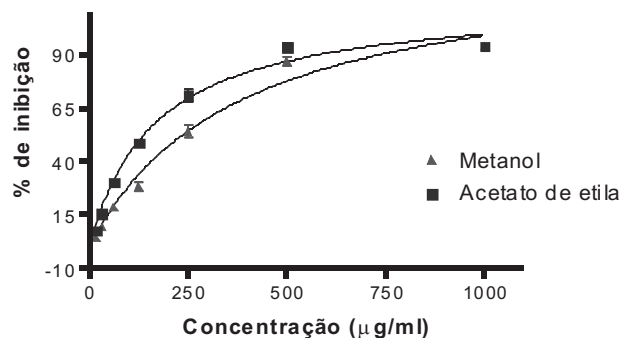


Figura 3: Atividade antioxidante dos extratos FAEMI e FMMI. Os resultados estão expressos como média ±EPM.

Com relação ao urucum, enquanto a fração

FAEBO apresentou a inibição de $86,5 \pm 2,4\%$ na concentração de $500 \mu\text{g/mL}$, a FMBO obteve $94,2 \pm 1,4\%$ na mesma concentração (Figura 4).

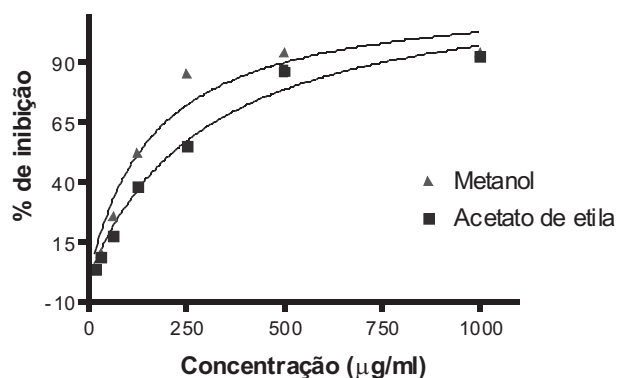


Figura 4: Atividade antioxidante dos extratos FAEBO e FMBO. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

Cromatografia de camada delgada com revelação em DPPH.

Para a confirmação da atividade antioxidante obtida nos ensaios anteriores, e também obter mais informações sobre o número de substâncias com capacidade antioxidante, foi realizada a CCD das amostras testadas. As placas cromatográficas foram posteriormente reveladas com DPPH, e assim, diferentes substâncias com capacidade antioxidante foram visualizadas como manchas amareladas, que representavam o ponto onde se localizavam substâncias que possuíam atividade antioxidante.

No cromatograma percebeu-se que as frações FAEBO e FMBO apresentam diferentes substâncias com atividade revelada pelo DPPH. Substâncias presentes na fração FMBO com $R_f = 0,88$; $0,77$ e $0,62$, além da substância na origem.

Da mesma forma, frações de *M. ilicifolia*, apresentaram principalmente nas frações mais polares, substâncias com capacidade antioxidante. Nas frações metanol e acetato de etila, substâncias com $R_f = 0,82$ e $0,72$ foram evidentes, além de uma mancha próxima à linha alcançada pela fase móvel. Resultados sugerem as catequinas como uma das possíveis substâncias ativas, ou ainda, a presença de flavonóides como elementos que possuem a capacidade antioxidante (CORSINO, 2003; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002).

Tanto no caso da *B. orellana* como no caso da *M. ilicifolia*, os extratos e frações que foram ativas nos experimentos *in vitro*, foram aquelas cuja a visualização em CCD e revelação com DPPH revelaram um maior número de substâncias ativas.

Conclusão

A partir dos resultados do presente estudo é possível concluir que as folhas dos extratos hidroalcoólicos de *B. orellana* e *M. ilicifolia* possuem poten-

te capacidade antioxidante, determinada pelo método de DPPH. Os extratos fracionados que apresentaram maior atividade antioxidante foram as frações acetato de etila e metanol, sugerindo que as substâncias ativas possuem características polares, tanto na *B. orellana*, como na *M. ilicifolia*. Os resultados da CCD com posterior revelação com DPPH, confirmaram os resultados obtidos nos testes *in vitro*.

Referências

- BADAMI, S. et al. Antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* heartwood. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 1534-1537, 2003.
- COELHO, A. M. S. P. et al. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). **Revista Lecta**, v. 21, p. 47-54, 2003.
- CORSINO, J. et al. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 8, p. 913-916, 2003.
- CUENDET, M. et al. A stilbene and dihydrochalcones with radical scavenging activities from *Loiseleuria procumbens*. **Phytochemistry**, v. 54, n. 8, p. 871-874, 2000.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu. 2002.
- GOVINDARAJAN, R. et al. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 10, p. 1424-1427, 2003.
- HARBORNE, J. B. Flavonoid bisulphates and their co-occurrences with ellagic acid in the Bixaceae, frankeniaceae and related families. **Phytochemistry**, v. 14, p. 1331-1337, 1975.
- ITOKAWA, H. et al. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 11, p. 3713-3716, 1991.
- LYNG, S. M. O.; PASSOS, M.; FONTANA, J. D. Bixin and α -cyclodextrin inclusion complex and stability tests. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 865-872, 2005.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.
- MAHAKUNAKORN, P. et al. Antioxidant and free radical-scavenging activity of choto-san and its related constituents. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 38-46, 2004.

MARIOT, M. P.; BARBIERI, R. L. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *M. aquifolium* Mart.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 3, p. 89-99, 2007.

MATSUURA, H. et al Isolation and measureret of quercetin glucosides in flower busds of Japanese Butterbur (*Petasites japonicus subsp. gigantea Kitam.*) **Bioscience, Biotechonology, and Biochemistry**, v. 66, n.7, p.1571-1575, 2002.

MAVI, R. et al. Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crussalaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 5, p. 702-705, 2004.

QUIAN, H.; NIHORIMBERE, V. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 5, n. 6, p. 676-683, 2004.

SILVA, F. A. M. et al. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SOUZA-FORMIGONI, M. L. et al. Anticulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n. 1, p. 21-27, 1991.

SOUZA, R. F. V.; GIOVANI, W. F. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. **Redox**, v. 9, n. 1, p. 97-104, 2004.

Recebido em: 12/06/2008

Aceito em: 20/10/2008

Received on: 12/06/2008

Accepted on: 20/10/2008